

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 35/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/26070 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1999 (27.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07423 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1998 (19.11.98) (30) Prioritätsdaten: 297 20 432.7 19. November 1997 (19.11.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MWG-BIOTECH AG [DE/DE]; Anzinger Strasse 7, D-85560 Ebersberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEIMBERG, Wolfgang [DE/DE]; Böhmerwaldstrasse 72, D-85560 Ebersberg (DE). WEICHSELGARTNER, Michael [DE/DE]; Im Tal 77, D-85560 Ebersberg (DE). GREBER, Martin [DE/DE]; Dr.-Wintrich-Ring 33, D-85560 Ebersberg (DE). KUTSCH, Peter [DE/DE]; Hoppenbichlerstrasse 24, D-83022 Rosenheim (DE). (74) Anwalt: GANAHL, Bernhard; Reinhardt Söllner Ganahl, Hausen 5b, D-85551 Kirchheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR AUTOMATIC IMPLEMENTATION OF CHEMICAL OR BIOLOGICAL METHODS (54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUM AUTOMATISCHEN DURCHFÜHREN VON CHEMISCHEN BZW. BIOLOGISCHEN VERFAHREN (57) Abstract <p>The invention relates to a device for automatic implementation of chemical or biological methods in sample receptacles, especially for sequencing or amplifying nucleic acid sequences. The inventive system comprises a pipette device and a thermocycler. The pipette device has a pipette arm for pipetting sample substances and/or chemicals. The invention is characterised in that the pipette device and thermocycler are embodied as separate workstations and a handling device is provided so that at least one sampling receptacle containing sample substances or chemicals can be displaced. Said receptacle is embodied separately from the work stations.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren in Probengefäßen, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, mit einer Pipettiereinrichtung und einem Thermocycler, wobei die Pipettiereinrichtung einen Pipettierarm zum Pipettieren von Probensubstanzen und/oder Chemikalien aufweist. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Pipettiereinrichtung und der Thermocycler als räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und daß eine Handhabungseinrichtung zum Bewegen von zumindest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeten Probengefäß vorgesehen ist.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Vorrichtung zum automatischen Durchführen
von chemischen bzw. biologischen Verfahren**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, mit einer Pipettiereinrichtung und einem Thermocycler, wobei die Pipettiereinrichtung einen Pipettierarm zum Pipettieren von Probensubstanzen und/oder Chemikalien aufweist.

Aus der US 5,443,791 geht eine Vorrichtung zum Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren hervor, die mehrere Arbeitsstationen aufweist. Diese Arbeitsstationen sind u.a. ein Thermocycler, eine aktiv gekühlte Enzymspeicherstation, eine Waschstation, eine Reagenzienspeicherstation und eine DNA-Probenstation. Bei dieser bekannten Vorrichtung wird eine Pipettierspitze in einer Ebene parallel zur Grundplatte bewegt, um einen Flüssigkeitstransfer auszuführen. Die Reaktionsgefäße dieser Vorrichtung sind als Mulden in einem im Thermocycler fest angeordneten Metallblock ausgebildet. Die einzelnen Reagenzien werden zunächst in einem der sich im Thermocycler befindlichen Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend einem Temperaturprofil unterzogen. Bevor eine weitere Reaktion ausgeführt werden kann, muß das bzw. müssen die Reaktionsgefäße gereinigt werden. Falls diese Reaktionsgefäße nicht vollständig gereinigt werden können, ergibt sich eine Kontamination der nachfolgenden Reaktionen, was bei sehr sensitiven Verfahren, wie dem PCR-Verfahren äußerst nachteilig ist. Zudem ist nachteilig, daß die Reaktionsgefäße als Mulden in einem Metallblock ausgebildet sind, die unmittelbar mit den Reagenzien in Kontakt kommen. Metallische Oberflächen können nicht immer absolut

rückstandsfrei mit vertretbarem Aufwand gereinigt werden und bilden eine weitere Quelle für Verunreinigungen.

Mit Thermocyclern können vorbestimmte Temperaturverläufe bzw.
5 Temperaturprofile abgefahren werden. Thermocycler werden insbesondere in der Gentechnik zum Sequenzieren und Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen verwendet. Solche Verfahren sind z.B. in EP 200 362 B1, EP 258 017 B1 und EP 201 184 B1 beschrieben.

10 Aus der DE 44 12 286 A1 ist ein System zum Verschließen von Probengefäßen mittels Deckel bekannt. Dieses System umfaßt eine Einrichtung zum Öffnen und Schließen der Reaktionsgefäße, die mittels eines Rastmechanismus einen Deckel erfassen kann und wieder abgeben kann.

15 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung der eingangs genannten Art derart weiterzubilden, daß mit ihr automatisch und kontaminationsfrei unterschiedlichste chemische bzw. biologische Verfahren, insbesondere zum Sequenzieren und
20 zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, ausgeführt werden können.

Die Aufgabe wird durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den
25 Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Pipettiereinrichtung und der Thermocycler als räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und daß ein Handhabungsarm zum Be-
30 wegen von zumindest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeten Probengefäß vorgesehen ist.

Diese räumliche Trennung der Pipettiereinrichtung und des Thermocyclers und das Vorsehen von den Arbeitsstationen unabhängig
35 ausgebildeter Reaktionsgefäße, die mittels eines Handhabungsarmes zwischen den einzelnen Arbeitsstationen bewegt werden, er-

laubt eine vollautomatische Ausführung komplexer chemischer und biologischer Verfahren mit einem hohen Durchsatz, da sich gleichzeitig in der Pipettiereinrichtung und im Thermocycler Reaktionsgefäße befinden und entsprechend bearbeitet werden können und keine aufwendigen Reinigungsvorgänge an der Vorrichtung ausgeführt werden müssen. Dies führt dazu, daß quasi gleichzeitig und/oder aufeinanderfolgend mehrere komplexe Verfahren, die insbesondere mit völlig unterschiedlichen Reagenzien und Probensubstanzen arbeiten, vollautomatisch ausgeführt werden können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt somit, daß komplexe chemische und biologische Verfahren, insbesondere das Sequenzieren und Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, vollautomatisch und kontaminationsfrei ausgeführt werden können. Dies stellt eine wesentliche Vereinfachung und eine deutliche Verbesserung der Genauigkeit und Sicherheit der Arbeitsvorgänge dar.

Die Ausführungsform nach Anspruch 3 mit einer multi-tasking-Steuerung erlaubt es, daß unterschiedliche Probensubstanzen, Applikationen usw. gleichzeitig mit dem Roboter abgearbeitet werden können, ohne daß hierzu eine Bedienperson zur Überwachung und Kontrolle der einzelnen Prozeßschritte notwendig ist. Hierdurch können komplexeste Verfahrensabläufe auf engstem Raum ohne die Gefahr von Fehlern durch Vertauschen oder dergleichen ausgeführt werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist eine Einrichtung zum automatischen Öffnen und Schließen von Probengefäßen mittels Deckel auf. Herkömmlicherweise wurde bei automatisch arbeitenden Vorrichtungen das Probengefäß mittels einer Wachs- oder Ölschicht verschlossen. Diese Art des Verschließens hat sich bei der manuellen Durchführung von chemischen und biologischen Reaktionen bewährt. Die Verwendung von lösbar an den Gefäßen befestigten Deckeln weist beim automatisierten Betrieb wesentliche Vorteile gegenüber den

herkömmlich verwendeten Wachs- und Ölschichten auf. So kann ein einmal mit Reagenzien und/oder Probensubstanzen gefülltes und mit einem Deckel verschlossenes Gefäß wieder geöffnet und zusätzliche Reagenzien und Probensubstanzen hinzugefügt werden.

5 Die Reagenzien und Probensubstanzen werden mittels einer Pipettierspitze in das Reaktionsgefäß eingebracht, wobei die Pipettierspitze mit kurzem Abstand über dem Flüssigkeitsspiegel im Reaktionsgefäß gehalten wird, so daß keine Berührung der Reaktionsspitze mit den im Reaktionsgefäß enthaltenen Reagenzien
10 und Probensubstanzen erfolgt. Hierdurch wird sicher eine Kontaminierung durch Übertragung von Reagenzien und Probensubstanzen von einem Reaktionsgefäß zu einem anderen Reaktionsgefäß vermieden.

15 Beim herkömmlichen Versiegeln der Reaktionsgefäße muß die Pipettierspitze beim Pipettieren durch die Wachs- bzw. Ölschicht hindurch stechen und in die im Reaktionsgefäß befindliche Flüssigkeit eintauchen. Bevor man mit der gleichen Pipettenspitze einem weiteren Reaktionsgefäß z.B. die gleiche Substanz zuführen kann, muß die Pipettenspitze gereinigt oder ausgetauscht
20 werden. Dies ist bei einer manuellen Ausführung von chemischen und biologischen Reaktionen üblich, erhöht bei einer vollautomatischen Ausführung der Reaktionen die Bearbeitungszeit und die Kosten.

25 Treten Bewegungen in der im Reaktionsgefäß enthaltenen Flüssigkeit, bspw. beim Bewegen des Reaktionsgefäßes oder bei einem Siedeverzug während einer Heizphase im Thermocycler auf, so kann eine solche Öl- bzw. Wachsschicht nicht sicher verhindern,
30 daß die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß austritt und z.B. in ein benachbart angeordnetes Reaktionsgefäß schwappt.

Zudem ist beim Versiegeln mit Wachs nachteilig, daß dieses beim Abkühlen auf tiefe Temperaturen (z.B. 14°C) erstarrt und die
35 weitere Behandlung behindert.

Die Erfindung wird nachfolgend beispielhaft anhand der beige-

fügten Zeichnungen näher erläutert. Sie zeigen schematisch in:

Fig. 1 ein Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in perspektivischer Ansicht,

5

Fig. 2 eine typische Anwendung in einem Flußdiagramm, und

Fig. 3 eine weitere Anwendung in einem Flußdiagramm.

- 10 Die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 weist eine rechteckförmige Grundplatte 2 mit zwei Stirnkanten 3 und einer vorderen und hinteren Längskante 4 auf. Auf der Grundplatte 2 ist an der hinteren Längskante 4 eine Rückenwandung 6 angeordnet. Am oberen Randbereich ist in der Rückenwandung 6 eine horizontale, zur hinteren Längskante 4 der Grundplatte 2 parallele Schiene 7 vorgesehen auf welcher ein Roboterarm 8 in Längsrichtung der Schiene 7 (Doppelpfeil 9, X-Richtung) verfahrbar angeordnet ist.
- 20 Der Roboterarm 8 ist ein geradliniger, steifer Arm, der parallel zu den Stirnkanten 3 der Grundplatte 2 angeordnet ist. Er steht somit senkrecht auf der Ebene der Rückenwandung 6. Der Roboterarm 8 weist zur äußeren Begrenzung zwei Längswandungen 10 und an seinem freien Ende eine Stirnwandung 11 auf, die in der Draufsicht U-förmig angeordnet sind. Zwischen den beiden Längswandungen 10 und mit Abstand zu diesen ist eine Schiene 12 angeordnet. An der Schiene 12 sind drei Z-Arme 13 - 15 in Längsrichtung der Schiene 12 (Y-Richtung) verfahrbar vorgesehen. Die Z-Arme 13 - 15 erstrecken sich jeweils vertikal durch einen Spalt 16 zwischen der Schiene 12 und den Längsseitenwandungen 10, wobei zwei der Z-Arme 13, 14 im linksseitigen Spalt 16 und der dritte Z-Arm 15 im rechtsseitigen Spalt 16 angeordnet sind.
- 30 Der Roboterarm 8 ist entlang der Schiene 7 (X-Richtung) und die Z-Arme 13 sind entlang (Y-Richtung) und senkrecht (Z-Richtung) zur Schiene 12 motorgetrieben verfahrbar, so daß die Z-Arme 13
- 35

- 15 im wesentlichen den gesamten Bereich (X-, Y-Richtung) oberhalb der Grundplatte 2 abfahren können und in der Höhe (Z-Richtung) verstellbar sind.

5 Der Z-Arm 13, der nachfolgend als Pipettierarm 13 bezeichnet wird, weist an seinem unteren Ende ein Aufnahmeelement für eine Pipettenspitze 20 (nur schematisch dargestellt) auf. Die Pipettenspitze ist über einen dünnen Schlauch 21 mit zwei Pumpen 22, 23 verbunden. Die Pumpe 22 ist eine sogenannte Spritzenpumpe
10 (syringe pump), mit welcher kleinste Volumina (1 µl) exakt abgemessen und dosiert gepumpt werden können. Die zweite Pumpe 23 ist eine Waschpumpe, die einen größeren Durchsatz (z.B. ≥ 100 ml/min) als die Spritzpumpe 22 aufweist und zum Waschen der Pipettenspitze 20 verwendet wird.

15 Der Z-Arm 14, der nachfolgend als Deckelbetätigungsarm 14 bezeichnet wird, ist an seinem unteren Ende mit einer Einrichtung 25 zum automatischen Öffnen und Schließen von Gefäßen versehen, wie sie aus DE 44 12 286 A1 und EP 734 769 A1 bekannt sind. Die
20 Einrichtung 25 kann mittels eines Rastmechanismus einen Deckel erfassen und wieder lösen.

Die die Proben und Chemikalien enthaltenden Gefäße können bei Gefahr von Kontamination mit jeweils einem Deckel versehen
25 sein, der vom Deckelbetätigungsarm 14 automatisch abgenommen und wieder aufgesetzt werden kann. Diese verschließbaren Gefäße werden insbesondere beim PCR-Verfahren eingesetzt. Beim Sequenzieren ist die Gefahr einer Kontamination geringer, weshalb der Einsatz derart verschließbarer Gefäße nicht zwingend notwendig
30 ist

Der dritte Z-Arm 15 wird nachfolgend als Handhabungsarm 15 bezeichnet. Er weist an seinem unteren Ende eine gabelförmige Halteeinrichtung 26 auf, mit welcher ähnlich wie bei Gabelstaplern Pipettierplatten (nicht dargestellt) aufgenommen, bewegt
35 und wieder abgesetzt werden können. In den Pipettierplatten sind mehrere in einem Rechteckraster angeordnete, mit einem

Deckel verschließbare Probengefäße ausgebildet. Diese Pipettierplatten können mit dem Handhabungsarm 15 auf der Grundplatte 2 beliebig versetzt werden.

5 Auf der Grundplatte 2 sind ein Probenhalter 27 und zwei Pipettierhalter 28 angeordnet. Der Probenhalter 27 und die Pipettierhalter 28 sind identisch ausgebildete Halterungen, auf welchen die Pipettierplatten einfach aufgesetzt werden. Die auf
10 diese exakt bzgl. der Grundplatte 2 ausgerichtet, so daß der Ort der einzelnen an den Pipettierplatten ausgebildeten Gefäße exakt festgelegt ist und diese vom Roboterarm, insbesondere dem Pipettierarm 13 und dem Deckelbetätigungsarm 14 genau angesteuert werden können. Die Pipettierhalter 28 legen Pipettierstationen fest, an welchen das Pipettieren ausgeführt wird.
15

Die Halter 27, 28 sind an der vorderen Längskante 4 der Grundplatte 2 angeordnet, so daß eine Bedienperson einfach Pipettierplatten darauf abstellen kann. Seitlich neben den Haltern
20 27, 28 ist eine Stapleinrichtung 29 vorgesehen, die als kleines Regal zum Zwischenspeichern von mehreren, z.B. 5 - 10 Pipettierplatten ausgebildet ist.

Am rückwärtigen Bereich der Grundplatte 2 sind ein Chemikalienreservoir 30, eine Waschstation 31, ein Pipettenspitzenmagazin
25 32 für Einweg-Pipettenspitzen und ein Pipettenspitzenabstreifer 33 zum Abstreifen der Einweg-Pipettenspitzen vorgesehen. Die Einweg-Pipettenspitzen sind im Pipettenspitzenmagazin 32 vertikal angeordnet, so daß der Pipettierarm 13 lediglich durch
30 Absenken seines unteren Endes in eine Einweg-Pipettenspitze eine solche aufnehmen kann. Nach Benutzung wird die Einweg-Pipettenspitze im Pipettenspitzenabstreifer 33 abgestriffen.

Am Pipettenspitzenabstreifer ist eine horizontal abstehender
35 Zeiger 34 aus einem elektrisch leitendem und elastischem Material angeordnet. Als Einweg-Pipettenspitzen werden Einweg-Pipettenspitzen verwendet, die aus einem leitfähigem Material

ausgebildet sind, wie z.B. einem Kunststoff, in dem Graphit eingelagert ist.

Nach dem Aufnehmen einer neuen Einweg-Pipettenspitze wird diese mit ihrem oberen, an den Pipettierarm 13 angrenzenden Randbereich mit dem Zeiger 34 in Kontakt oder in seine Nähe gebracht. Der Zeiger 34 ist mit einer Meßeinrichtung verbunden, die eine kapazitiven Messung ausführt. Aufgrund des Ergebnisses dieser kapazitiven Messung kann beurteilt werden, ob eine Einweg-Pipettenspitze am Pipettierarm vorhanden ist, oder ob die Aufnahme der Einweg-Pipettenspitze nicht funktioniert hat. Mit dem Zeiger und der Meßeinrichtung kann somit die Aufnahme einer neuen Einweg-Pipettenspitze kontrolliert werden. Ein wesentlicher Vorteil dieser Kontrolleinrichtung ist, daß bei der Kontrolle die Einweg-Pipettenspitze mit ihrem spitzen Ende nicht mit irgendeinem Gegenstand in Kontakt gebracht werden muß, wie es von herkömmlichen Kontrolleinrichtungen bekannt ist, sondern die Kontrolle der Aufnahme der Einweg-Pipettenspitzen absolut kontaminationsfrei erfolgen kann.

Bei Verwendung einer Mehrweg-Pipette kann diese bei Bedarf zwischen den einzelnen Pipettiervorgängen in die Waschstation 31 eingefügt und zum Reinigen mittels der Waschpumpe 23 mit einer größeren Menge an Wasser durchspült werden.

Im Chemikalienreservoir 30 sind mehrere nach oben offene Gefäße mit diversen Chemikalien angeordnet. Die Gefäße des Chemikalienreservoirs 30 können auch mittels Deckel verschlossen sein, die von dem Deckelbetätigungsarm 14 abgenommen und wieder aufgesetzt werden können.

Erfindungsgemäß ist ein Thermocyclerbehälter 35 auf der Grundplatte 2 angeordnet. Der Thermocyclerbehälter 35 besteht aus einem oben offenen Grundkörper 36, der mittels eines Deckels 37 verschlossen werden kann. Der Deckel 37 ist mit einem Scharniergelenk 38 am Grundkörper 36 befestigt, und um dieses Gelenk mittels eines Motors (nicht dargestellt) zum automatischen Öff-

nen und Schließen des Thermocyclerbehälters 35 verschwenkbar. Im Thermocyclerbehälter 35 sind Heiz- und Kühlelemente vorgesehen, die den Innenraum auf eine bestimmte Temperatur einstellen können. Mit den Heiz- und Kühlelementen ist es auch möglich, 5 bestimmte Temperaturverläufe abzufahren. Als Heiz- und Kühlelement wird vorzugsweise ein Peltierelement verwendet, das sowohl Wärme ab- als auch zuführen kann. Ein typischer Temperaturbereich eines solchen Thermocyclers erstreckt sich von -5°C bis 120°C, und die Temperatur kann mit einer Heiz-/Kühlrate von 10 2°C/s bis 5°C/s verändert werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist eine zentrale Steuereinrichtung auf, die sowohl die Bewegung des Roboterarms 8 mit seinen Z-Armen 13 bis 16, als auch die einzelnen Funktionselemente, wie z.B. die Pumpen 22, 23, und den integrierten Thermocycler ansteuert. Diese Steuereinrichtung ist in der Rückenwandung 6 angeordnet. Sie kann aber auch in einem separaten Gehäuse untergebracht sein oder durch einen separaten Computer 15 dargestellt werden. Die Steuereinrichtung ist vorzugsweise eine prozessorgesteuerte Vorrichtung und als multi-tasking-Steuerung 20 ausgebildet, d.h., daß sie gleichzeitig mehrere Steuerungsvorgänge ausführen und überwachen kann.

Die Steuereinrichtung ist mit einer Schnittstelle zu einem Computer 25 versehen. Im Computer sind mehrere Datenbanken abgespeichert, in welchen die Daten für die einzelnen Applikationen, Probenverwaltung, Chemikalien und Cycler-Programme enthalten sind. Ein Benutzer muß lediglich eine zu untersuchende bzw. zu bearbeitende Probe eingeben, die Art der Applikation (Sequenzieren, Amplifizieren, usw.), die Chemikalien und das Cyclerprogramm 30 auswählen, sofern die letzteren Daten (Chemikalien, Cyclerprogramm) nicht bereits durch die Applikation vorgegeben sind, und die Probe auf dem Probenhalter 27 plazieren.

35 Die erfindungsgemäße Vorrichtung öffnet dann mit dem Deckelbetätigungsarm 14 die die Probensubstanzen und Chemikalien enthaltenden Gefäße, überträgt Teile der Probensubstanzen in die

Reaktionsgefäße der auf den Pipettierhaltern 28 angeordneten
Pipettierplatten und versetzt die Probensubstanzen mit den ent-
sprechenden Chemikalien aus dem Chemikalienreservoir 30. Beim
Pipettieren werden die Pipettenspitzen vorzugsweise mit gerin-
5 gem Abstand über dem Flüssigkeitsspiegel in den Reaktionsgefä-
ßen gehalten. Hierdurch wird verhindert, daß Reagenzien und
Probesubstanzen eines Reaktionsgefäßes in ein anderes Reakti-
onsgefäß übertragen werden. Dies ist besonders von Vorteil,
wenn mehreren Reaktionsgefäßen einer Pipettierplatte die glei-
10 che Substanz zugeführt werden soll, da dies ohne Reinigung der
Pipettenspitze zwischen den einzelnen Pipettiervorgängen
schnell ausgeführt werden kann.

Die Pipettierplatten werden nach dem Pipettieren vom Handha-
15 bungsarm 15 entweder direkt in den Thermocyclerbehälter 35 ein-
gesetzt oder an der Stapleinrichtung 29 zwischengespeichert
und zu einem geeigneten späteren Zeitpunkt dem Thermocyc-
lerbehälter 35 zugeführt.

20 Während im Thermocyclerbehälter 35 eine Probe einem bestimmten
Temperaturverlauf unterzogen wird, kann eine weitere Probe mit
anderen Probensubstanzen und einer anderen Applikation bereits
pipettiert werden.

25 Fig. 2 zeigt ein Flußdiagramm einer typischen, einfachen Appli-
kation der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Amplifizieren ei-
ner DNA-Probe. Bei dieser Applikation soll eine DNA-Probe am-
plifiziert, dann sequenzspezifisch gespalten und für eine elek-
trophoresische Untersuchung vorbereitet werden.

30 Hierzu wählt der Bediener an einem auf einem Bildschirm des
Computers dargestellten Menü die Probensubstanz, eine vorbe-
stimmte Mischung von für das Amplifizieren geeigneten Enzymen,
eine weitere vorbestimmte Mischung für das sequenzspezifische
35 Spalten der amplifizierten DNA-Probe und ein Gel und eine Puf-
ferlösung zur Vorbereitung der elektrophoresischen Untersu-
chung.

Der Computer erstellt dann selbsttätig sogenannte Pipettier-
(Pipette.scr) und Thermocycler-Scripte (Cycler.scr) nach Maßga-
be der festgelegten Probensubstanzen und Reagenzien. Diese
5 Scripte enthalten alle zum Füllen der Reaktionsgefäße und zum
Inkubieren notwendigen Steuerbefehle, einschließlich der Trans-
portbefehle zum Bewegen der Pipettierplatten und der Befehle
zum Öffnen und Schließen der Deckel. Die Thermocycler-Scripte
enthalten auch das im Thermocycler auszuführende Temperaturpro-
10 fil, das bei Bedarf manuell abgeändert werden kann.

Während eines ersten Arbeitsschrittes S1 wird ein Pipettier-
script ausgeführt. Hierdurch werden die Gefäße einer Pipettier-
platte mit den ausgewählten Probensubstanzen und Reagenzien ge-
15 füllt und danach die Pipettierplatte dem Thermocycler zuge-
führt.

Bei einem zweiten Schritt S2 wird im Thermocycler ein Tempera-
turprofil abgefahren, um die DNA-Probe gemäß einem an sich be-
20 kannten PCR-Verfahren zu amplifizieren. Ist der Amplifikations-
vorgang abgeschlossen, wird die Pipettierplatte zu einem Pipet-
tierhalter bewegt.

Im Schritt S3 wird ein weiteres Pipettierscript ausgeführt, wo-
25 bei den Reaktionsgefäßen eine vorbestimmte Mischung von Re-
striktionsendonucleasen hinzugefügt werden. Die Pipettierplatte
wird dann wieder zum Thermocycler transportiert und in diesen
eingesetzt.

30 Im nachfolgenden Schritt S4 werden die DNA-Proben sequenzspezi-
fisch gespalten, indem sie z.B. für 2 Stunden einer Temperatur
von 37°C unterzogen werden, bei welcher die Restriktionsendo-
nucleasen besonders aktiv sind. Danach wird die Temperatur
kurzzeitig auf z.B. 95°C erhöht, wodurch die Restriktionsendo-
35 nucleasen deaktiviert werden. Ist das Spalten der DNA-Proben
abgeschlossen, wird die Pipettierplatte wieder zu einer der Pi-
pettierhalterungen 28 bewegt.

Bei einem Schritt S5 werden den Reaktionsgefäßen Gel und eine Pufferlösung zur Vorbereitung einer elektrophoresischen Untersuchung hinzugefügt.

5

Die Pipettierplatte mit den fertig aufbereiteten DNA-Sequenzen kann nun von einer Bedienperson abgenommen oder automatisch in der Stapleinrichtung 29 abgestellt werden.

10

Fig. 3 zeigt den Ablauf eines weiteren Verfahrens, das mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung vollautomatisch ausgeführt werden kann. Dieses Verfahren dient zur Bestimmung von Längenpolymorphismen in DNA-Bereichen, wie es bspw. im Patent EP 438 512 B1 (=US 5,766,847) beschrieben ist.

15

Die Probensubstanz weist hierbei vollständige Zellen auf, die mittels einer Proteinase K in den Schritten S11 und S12 lysiert werden.

20

Im Schritt S13 wird ein Gemisch aus Zufalls-Primern (PEP; Primer-Extension-Protocol) hinzugefügt und im Schritt S14 gemäß einem PCR-Verfahren amplifiziert.

25

Danach wird im Schritt S15 eine Mischung aus mehreren Primern und Enzymen zur Detektion von sich wiederholenden simplen bzw. kryptisch simplen DNA-Sequenzen (STR; Short-Tandem-Repeats) zugegeben und anschließend das entsprechende PCR-Verfahren ausgeführt (Schritt S16).

30

Die in den Fig. 2 und 3 dargestellten Verfahren bzw. Applikationen sind lediglich zwei Beispiele einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Mehrere dieser Applikationen sind in der Steuereinrichtung vorab programmiert. Der Bediener kann jedoch auch eigene Applikationen mit einer beliebigen Folge von Pipettier- und Thermocycler-Scripten zusammenstellen. Die Verfahren können beliebig kompliziert sein und z.B. ein Umschreiben von RNAs auf DNAs umfassen

35

und sind mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung dennoch vollautomatisch durchführbar.

Insbesondere können unterschiedliche Applikationen gleichzeitig
5 bzw. aufeinanderfolgend automatisch ausgeführt werden, ohne daß
ein Bediener die einzelnen Verfahrensschritte überwachen muß.
Es ist auch möglich, daß eine Anwendung im Thermocycler und eine
andere Anwendung an der Pipettierstation gleichzeitig abge-
arbeitet wird. Hierzu ist die Steuereinrichtung mit einer zu-
10 sätzlichen Funktion ausgestattet, die den in der Regel zeitlich
kürzeren Pipettiervorgang so startet, daß er gleichzeitig mit
der parallel im Thermocycler ablaufenden Inkubation endet. Das
beim Pipettiervorgang aufbereitete Gemisch wird somit ohne
Standzeit dem Thermocycler zugeführt, wodurch unerwünschte Re-
15 aktionen vermieden werden.

Mit der Erfindung wird somit eine Vorrichtung geschaffen, die
die vollständige automatische Abarbeitung komplexer chemischer
bzw. biologischer Verfahren, insbesondere PCR-Verfahren er-
20 laubt, wobei eine maximale Flexibilität bzgl. der Art des ange-
wandten Verfahrens erzielt wird. Es können somit komplexeste
Verfahrensabläufe auf engstem Raum ohne der Gefahr von Fehlern
durch Vertauschen oder dergleichen ausgeführt werden. Komplexe-
ste chemische bzw. biologische Verfahren, insbesondere das Se-
25 quenenzieren und Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, können
vollautomatisch mit hoher Effizienz und hohem Durchsatz durch-
geführt werden.

Ansprüche

5

1. Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen
bzw. biologischen Verfahren in Probengefäßen, insbesondere
zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäurese-
quenzen, mit einer Pipettiereinrichtung und einem Ther-
mocycler, wobei die Pipettiereinrichtung (27, 28) einen
Pipettierarm (13) zum Pipettieren von Probensubstanzen
und/oder Chemikalien aufweist,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Pipettiereinrichtung und der Thermocycler als
räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und
daß eine Handhabungseinrichtung (15) zum Bewegen von zumin-
dest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden
und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeten Proben-
gefäß vorgesehen ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß mehrere Probengefäße in einer Pipettierplatte ausge-
bildet sind, wobei die Pipettierplatte vom Handhabungsarm
(15) bewegbar ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Vorrichtung (1) eine Steuereinrichtung zum Ansteu-
ern eines Pipettierarms (13), eines Handhabungsarms (15)
und des Thermocyclers (35-38) aufweist, wobei die Steuer-
einrichtung als multi-tasking-Steuereinrichtung ausgebil-
det ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,

35

daß die Vorrichtung (1) einen Roboterarm (8) aufweist, der an einer Schiene (7) oberhalb einer Grundplatte (2) verfahrbar ist, und

5 daß der Pipettierarm (13) und der Handhabungsarm (15) jeweils am Roboterarm (8) angeordnet und vertikal und in Längsrichtung des Roboterarms (8) verfahrbar sind.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet,

10 daß der Pipettierarm (13) an seinem unteren Ende eine Pipettenspitze aufnehmen kann und diese über einen dünnen Schlauch (21) mit zumindest einer Pumpe (22, 23) verbunden ist,

15 daß sowohl eine fein dosierbare Pumpe (22), z.B. eine Spritzenpumpe, als auch eine Pumpe (23) mit einem höheren Durchsatz als die feindosierbare Pumpe (22) zum Spülen einer Mehrweg-Pipettenspitze mit der Pipettenspitze verbunden sind, und

20 daß die Vorrichtung (1) ein Pipettenspitzenmagazin (32) für Einweg-Pipettenspitzen und einen Pipettenspitzenabstreifer (33) zum Abstreifen der Einweg-Pipettenspitzen aufweist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,

25 **dadurch gekennzeichnet,**

 daß die Vorrichtung (1) einen Deckelbetätigungsarm (14) zum automatischen Öffnen und Schließen von Gefäßen aufweist.

30 7. Vorrichtung nach Anspruch 6,

dadurch gekennzeichnet,

 daß der Pipettierarm (13), der Deckelbetätigungsarm (14) und der Handhabungsarm (15) jeweils als vertikal angeordnete und vertikal und in Längsrichtung des Roboterarms (8) verfahrbare Z-Arme ausgebildet sind.

35

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Vorrichtung (1) eine Stapleinrichtung (29) zum Zwischenspeichern von Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden Gefäßen, insbesondere von Pipettierplatten, an welchen derartige Gefäße ausgebildet sind, aufweist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,

dadurch gekennzeichnet,

daß der Thermocycler einen Behälter bestehend aus einem Grundkörper (36) und einem Deckel (37) zum Verschließen des Behälters (35) aufweist, wobei ein Stellglied zum selbsttätigen Öffnen und Schließen des Behälters (35) vorgesehen ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß zum Kontrollieren, ob eine Einweg-Pipettenspitze an einem Pipettierarm (13) angeordnet ist, ein elektrisch leitender, frei abstehender Zeiger (34) vorgesehen ist, der mit einer Meßeinrichtung verbunden ist.

11. Verfahren zum Ansteuern einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,

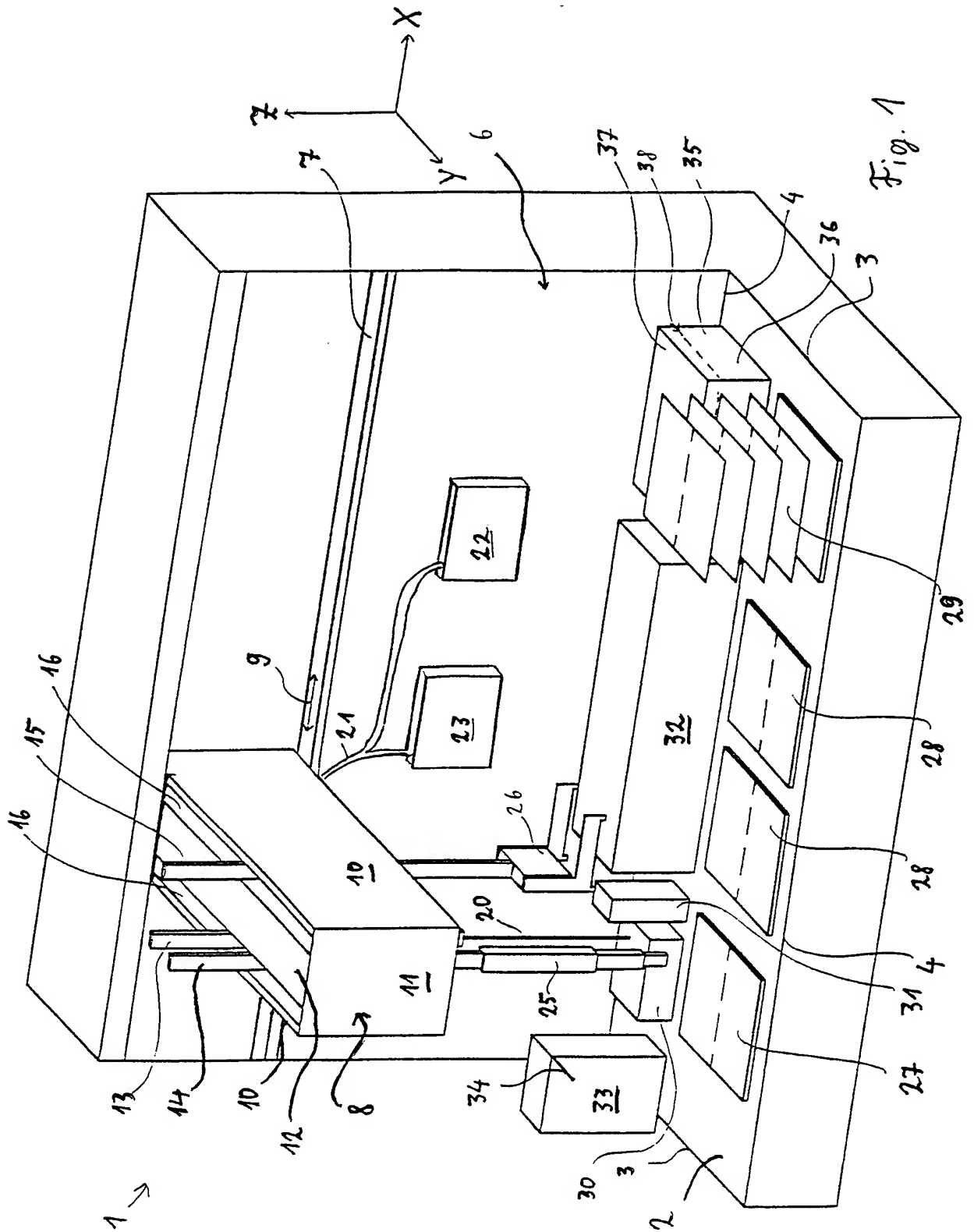
dadurch gekennzeichnet,

daß beim Pipettieren eine Pipettierspitze mit Abstand über dem Flüssigkeitspiegel im jeweiligen Reaktionsgefäß gehalten wird.

12. Verfahren zum Ansteuern einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, insbesondere nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet,

daß zwei unterschiedliche Applikation gleichzeitig ausgeführt werden, wobei die Steuereinrichtung den Beginn eines Pipettiervorganges und einer Inkubation im Thermocycler selbsttätig derart festlegt, daß sie im wesentlichen gleichzeitig enden.



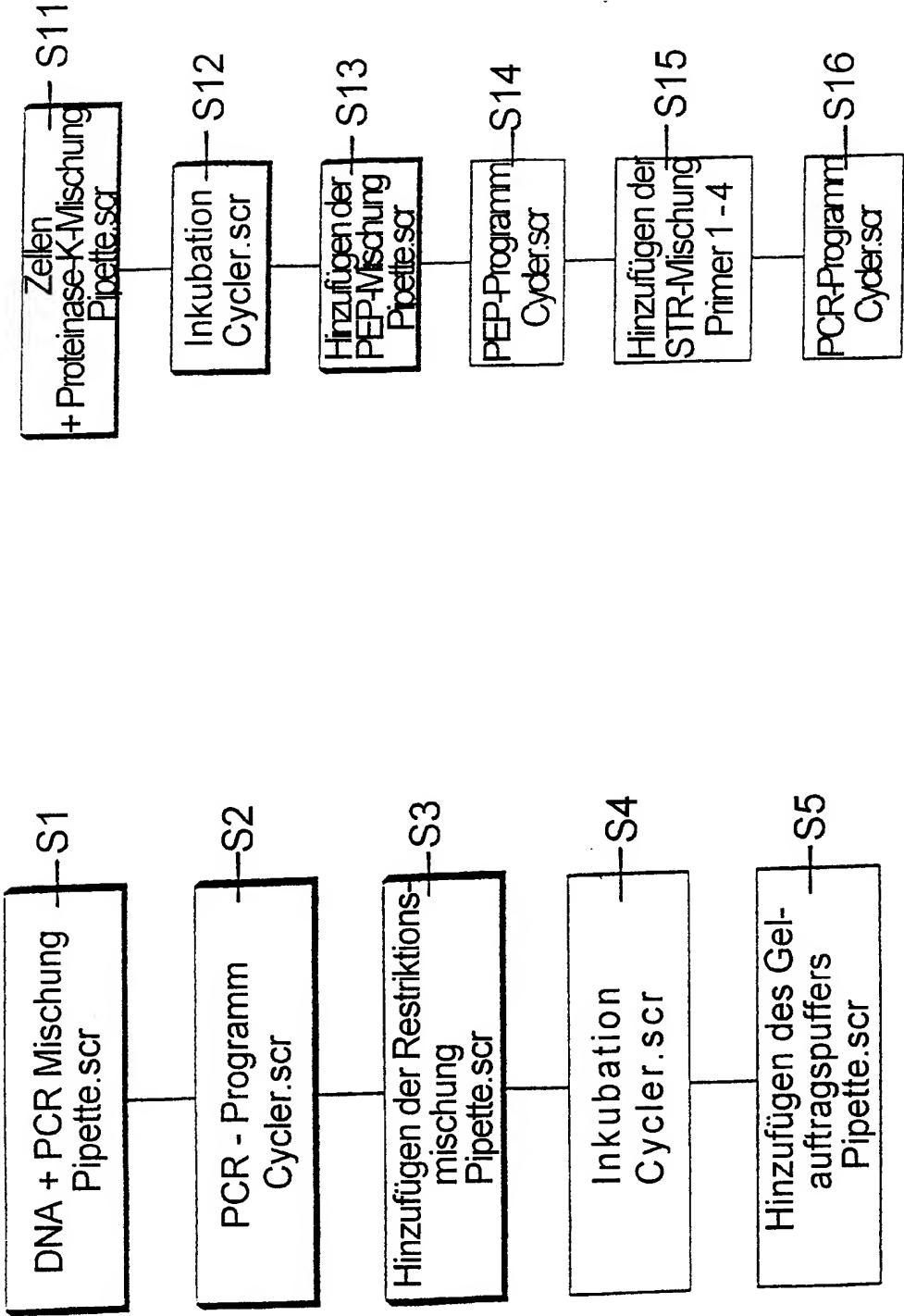


Fig. 2

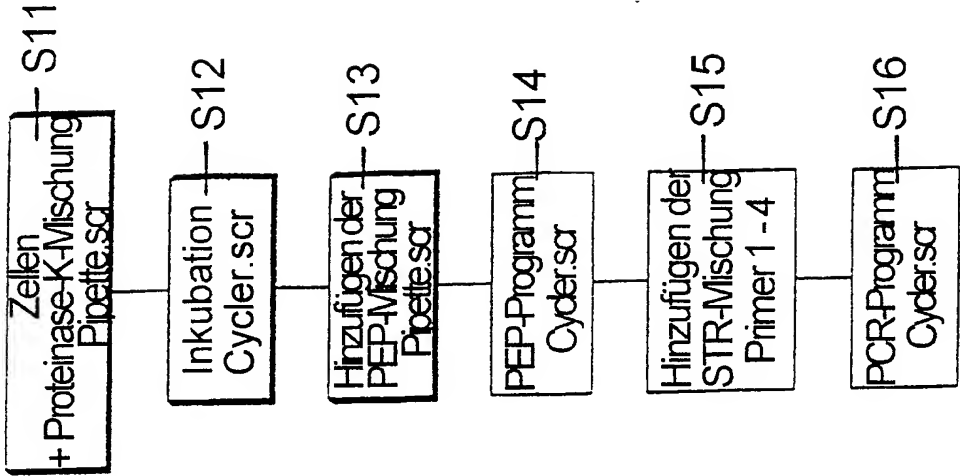


Fig. 3

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :**B01J 19/00, B01L 11/00, C12Q 1/68,
C12P 19/34****A3**(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/26070**(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

27. Mai 1999 (27.05.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/07423

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1998
(19.11.98)

(30) Prioritätsdaten:

297 20 432.7 19. November 1997 (19.11.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
MWG-BIOTECH AG [DE/DE]; Anzinger Strasse 7,
D-85560 Ebersberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEIMBERG, Wolfgang
[DE/DE]; Böhmerwaldstrasse 72, D-85560 Ebersberg
(DE). WEICHSELGARTNER, Michael [DE/DE]; Im
Tal 77, D-85560 Ebersberg (DE). GREBER, Martin
[DE/DE]; Dr.-Wintrich-Ring 33, D-85560 Ebersberg
(DE). KUTSCH, Peter [DE/DE]; Hoppenbichlerstrasse 24,
D-83022 Rosenheim (DE).(74) Anwalt: GANAHL, Bernhard; Reinhardt Söllner Ganahl,
Hausen 5b, D-85551 Kirchheim (DE).(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

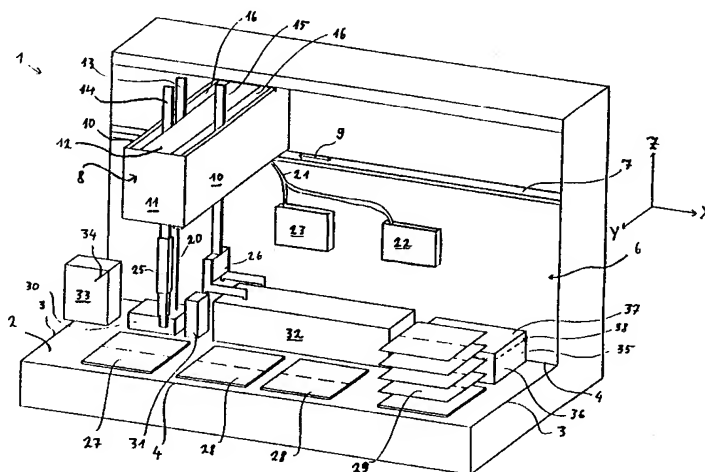
Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-
richts:

15. Juli 1999 (15.07.99)

(54) Title: METHOD FOR AUTOMATIC IMPLEMENTATION OF CHEMICAL OR BIOLOGICAL METHODS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUM AUTOMATISCHEN DURCHFÜHREN VON CHEMISCHEN BZW. BIOLOGISCHEN
VERFAHREN**(57) Abstract**

The invention relates to a device for automatic implementation of chemical or biological methods in sample receptacles, especially for sequencing or amplifying nucleic acid sequences. The inventive system comprises a pipette device and a thermocycler. The pipette device has a pipette arm for pipetting sample substances and/or chemicals. The invention is characterised in that the pipette device and thermocycler are embodied as separate workstations and a handling device is provided so that at least one sampling receptacle containing sample substances or chemicals can be displaced. Said receptacle is embodied separately from the work stations.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren in Probengefäßen, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, mit einer Pipettiereinrichtung und einem Thermocycler, wobei die Pipettiereinrichtung einen Pipettierarm zum Pipettieren von Probensubstanzen und/oder Chemikalien aufweist. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Pipettiereinrichtung und der Thermocycler als räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und daß eine Handhabungseinrichtung zum Bewegen von zumindest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeten Probengefaß vorgesehen ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 98/07423

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

B 01 J 19/00, B 01 L 11/00, C 12 Q 1/68, C 12 P 19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK6

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

B 01 J, C 12 P, G 01 N, C 12 Q, B 01 L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5443791 A (CATHCART et al.) 22. August 1995 (22.08.95), Spalte 6, Zeile 40 - Spalte 9, Zeile 40, Spalte 17, Zeile 31 - Spalte 21, Zeile 27, Zeichnungen, Ansprüche (in der Beschreibung ge- nannt). --	1-12
A	DE 4412286 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 12. Oktober 1995 (12.10.95), Spalte 2, Zeile 53 - Spalte 4, Zeile 1, Zeichnungen, Ansprüche (in der Beschreibung ge- nannt). --	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist.

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25 März 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28.04.99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

TENGLER e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EP 0201184 A2 (CETUS CORPORATION) 17. Dezember 1986 (17.12.86), Ansprüche (in der Beschreibung ge- nannt). -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/07423

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B 01 J 19/00, B 01 L 11/00, C 12 Q 1/68, C 12 P 19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B 01 J, C 12 P, G 01 N, C 12 Q, B 01 L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5443791 A (CATHCART et al.) 22. August 1995 (22.08.95), Column 6, Line 40- Column 9, Line 40, Column 17, Line 31- Column 21, Line 27, Drawings, claims (Cited in the description).	1-12
A	DE 4412286 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 12. Oktober 1995 (12.10.95), Column 2, Line 53- Column 4, Line 1, Drawings, claims (cited in the description).	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 1999 (25.03.99)

Date of mailing of the international search report

28.04.99 (28.04.99)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/07423

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0201184 A2 (CETUS CORPORATION) 17. December 1986 (17.12.86), claims (cited in the description)	1